

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 1 1 月 8 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 3 2 3 3 5 8

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

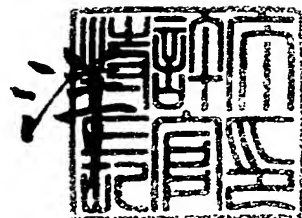
J P 2 0 0 4 - 3 2 3 3 5 8

出 願 人
Applicant(s): 松下電器産業株式会社

2 0 0 5 年 8 月 1 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	付訂願
【整理番号】	2161760510
【提出日】	平成16年11月 8日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12M 1/34
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電子部品株式会社内
【氏名】	中谷 将也
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内
【氏名】	尾崎 亘彦
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内
【氏名】	岡 弘章
【特許出願人】	
【識別番号】	000005821
【氏名又は名称】	松下電器産業株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100097445
【弁理士】	
【氏名又は名称】	岩橋 文雄
【選任した代理人】	
【識別番号】	100103355
【弁理士】	
【氏名又は名称】	坂口 智康
【選任した代理人】	
【識別番号】	100109667
【弁理士】	
【氏名又は名称】	内藤 浩樹
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	011305
【納付金額】	16,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1
【包括委任状番号】	9809938

【請求項 1】

複数のウエルからなるウエルアレイと、少なくとも片面に第一のキャビティと第三のキャビティを設けたプレートと、この第一のキャビティの内部にセンサ素子を配置して前記プレートの第三のキャビティと連結するとともにプレートの外方へ通じる流路を設けた細胞電位測定プローブであって、前記センサ素子は片面に第二のキャビティを設けた支持基板と、この第二のキャビティの底面に設けた薄板とを有し、この薄板には少なくとも一つ以上の貫通孔を設け、この貫通孔の片面の開口部は前記センサ素子の上面側に通じ、他面側の開口部はプレートの内方に設けた流路に通じ、前記プレートの外方へ通じる流路の開口部を前記プレートの上面側に設け、このプレートの上部に所定の液体を保持あるいは循環させるための貫通孔を有した複数のウエルからなるウエルアレイを設けた細胞電位測定プローブ。

【請求項 2】

プレートの上に配置したウエルの貫通孔をすり鉢状とした請求項 1 に記載の細胞電位測定プローブ。

【請求項 3】

ウエルアレイを少なくとも被験体細胞を含む液体を投入するウエルと、被験体細胞との反応を検査する液体を投入するウエルと、吸引手段に接続されたウエルで構成した請求項 1 に記載の細胞電位測定プローブ。

【請求項 4】

少なくとも被験体細胞を含む液体を投入するウエルをセンサ素子の上面に配置した請求項 3 に記載の細胞電位測定プローブ。

【請求項 5】

センサ素子の上に配置したウエルの上面に形成した貫通孔より測定電極を配置した請求項 4 に記載の細胞電位測定プローブ。

【請求項 6】

センサ素子の上面に配置したウエルの底面にある貫通孔の大きさを薄板の外形より大きくした請求項 4 に記載の細胞電位測定プローブ。

【請求項 7】

薬液を投入するウエルと吸引手段に接続されたウエルのプレートの上面に設けた貫通孔の大きさをそれぞれに接続された流路の開口部の大きさより大きくした請求項 3 に記載の細胞電位測定プローブ。

【請求項 8】

プレートの上面と、プレートの上に配置したウエルアレイの底面を同一面とした請求項 1 に記載の細胞電位測定プローブ。

【請求項 9】

ウエルアレイをプレートと同じ材質とした請求項 1 に記載の細胞電位測定プローブ。

【請求項 10】

プレートとウエルアレイをガラス、石英で形成した請求項 9 に記載の細胞電位測定プローブ。

【請求項 11】

プレートとウエルアレイをポリスチレンで形成した請求項 9 に記載の細胞電位測定プローブ。

【請求項 12】

ウエルアレイと、少なくとも片面に第一のキャビティと第三のキャビティを設けたプレートと、この第一のキャビティの内部にセンサ素子を配置して前記プレートの第三のキャビティと連結するとともにプレートの外方へ通じる流路を設けた細胞電位測定プローブであって、前記センサ素子は片面に第二のキャビティを設けた支持基板と、この第二のキャビティの底面に設けた薄板とを有し、この薄板には少なくとも一つ以上の貫通孔を設けてなり、この貫通孔の片面側の開口部は前記センサ素子の上面側に通じ、他面側の開口部はブ

・ プレートの内方に設けた流路に通し、前記プレートの外方に通じる流路の開口部は前記プレートの上面側に形成し、このプレートの上部に所定の液体を保持あるいは循環させるための貫通孔を有した複数のウェルからなるウェルアレイを設けた細胞電位測定プローブを複数配置した細胞電位測定プローブアレイ。

【発明の名称】 細胞電位測定プローブおよび細胞電位測定プローブアレイ

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞の活動によって発生する物理化学的変化を測定するために用いられる細胞内電位あるいは細胞外電位（以下細胞電位とする）を測定するための細胞電位測定プローブおよび細胞電位測定プローブアレイに関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来、細胞の電氣的活動を指標にして、薬理効果のある薬品をスクリーニングする方法としてパッチクランプ法が行われている。

【0003】

このパッチクランプ法を改良する目的で、細胞の保持手段を有した基板およびこれに設けられた電極によって細胞電位を測定するデバイスも発明者らのグループにより提案されている（例えば、特許文献1参照）。

【0004】

この方法はパッチクランプ法で得られるデータと同等の高品質なデータが得られ、しかも細胞へのアタッチが簡単に行えるので簡易に高速で大量の試料を測定できるものである。

【0005】

この細胞電位測定デバイスの動作について図面を用いて説明する。

【0006】

図5は前記特許文献1で開示される細胞電位測定デバイスの構造を模式断面図で示したものであり、容器31の内部に培養液33が入れられ、被験体細胞34は基板35に設けられた細胞保持手段によって捕捉または保持されている。細胞保持手段は基板35に形成された窪み36および開口部37を有するとともに前記窪み36に連絡する貫通孔38を備えた構成となっている。

【0007】

さらに、容器31の中には参照電極30、貫通孔38の周辺にはセンシング手段である測定電極39が配置されており、この測定電極39は配線を経て信号検出部に連結されている。

【0008】

そして、測定の際には被験体細胞34を貫通孔38側から吸引ポンプなどの手段により、この被験体細胞34が窪み36部分に密着保持される。このようにして被験体細胞34の活動により発生する電気信号は容器31中の培養液33側に漏れることなく、貫通孔38側に設けた測定電極39と参照電極30との電位差として検出される。

【特許文献1】 国際公開第02/055653号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

しかしながら、前記従来の構成では、基板35によって隔てられた2つの領域、つまり被験体細胞34側の領域と、測定電極39側の領域において、それぞれ導入する培養液33あるいは薬液の種類を別々にすることができないという課題があった。

【0010】

本発明は、前記従来の課題を解決するもので、被験体細胞34が存在する領域と測定電極39が存在する領域にそれぞれ、別種類の培養液33もしくは測定液（薬液）を簡便に導入することが可能な細胞電位測定プローブおよび細胞電位測定プローブアレイを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

前記鉢越を形成するために、本発明は、複数のウェルからなるウェルアレイと、上面に第一のキャビティと第三のキャビティを設けたプレートと、この第一のキャビティの内部にセンサ素子を配置して前記プレートの第三のキャビティと連結するとともにプレートの外方へ通じる流路を設けた細胞電位測定プローブであって、前記センサ素子は片面に第二のキャビティを設けた支持基板と、この第二のキャビティの底面に設けた薄板とを有し、この薄板には少なくとも一つ以上の貫通孔を設け、この貫通孔の片面側の開口部は前記センサ素子の上面側に通じ、他面側の開口部はプレートの内方に設けた流路に通じ、前記プレートの外方へ通じる流路の開口部を前記プレートの上面側に設け、このプレートの上部に所定の液体を保持あるいは循環させるための貫通孔を有した複数のウェルからなるウェルアレイを設けた構成とするものである。

【発明の効果】

【0012】

本発明の細胞電位測定プローブおよび細胞電位測定プローブアレイは、被験体細胞が存在する領域と測定電極が存在する領域にそれぞれ、別種類の液体、例えば培養液もしくは測定液を簡便に導入することができる細胞電位測定プローブおよび細胞電位測定プローブアレイを実現することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

（実施の形態1）

以下、本発明の実施の形態1における細胞電位測定プローブおよび細胞電位測定プローブアレイについて、図面を参照しながら説明する。

【0014】

図1は本発明の実施の形態1における細胞電位測定プローブの分解斜視図であり、図2はその断面斜視図であり、図3は図2の要部拡大断面図である。また、図4は細胞電位測定プローブアレイの分解斜視図である。

【0015】

まず始めに、細胞電位測定プローブの構成について説明する。図1～図3に示すように、本発明の実施の形態1における細胞電位測定プローブ1は樹脂あるいはガラスなどの絶縁体よりなるプレート2と、センサ素子4と、ウェルアレイ20から構成しており、このプレート2の上面には第一のキャビティ3を形成し、下面には第三のキャビティ6を形成しており、この第一のキャビティ3の内部にはセンサ素子4をはめ込んでいる。

【0016】

また、センサ素子4の下部にある第三のキャビティ6には外方へ通じる流路として第一の流路9と第二の流路10を設けている。そして、この第一の流路9にはプレート2の上面に設けた第一の流路開口部11を設け、第二の流路10には同じくプレート2の上面に設けた第二の流路開口部18を設けている。このことにより、第一および第二の流路9、10の外部との接続を実現している。

【0017】

ここで、このような構造を有するプレート2は別々の成型プレート2a、2bをあらかじめ成型しておき、その後貼り合わせることで複雑な形状のものを容易に形成することができる。

【0018】

次に、センサ素子4の構成について説明する。センサ素子4は、図3に示したように片面に第二のキャビティ5を設けた支持基板12と、この第二のキャビティ5の底面に形成した薄板7とを有し、この薄板7には少なくとも一つ以上の微小貫通孔8を設けている。この微小貫通孔8の上面に被験体細胞が保持されることになる。従って、この微小貫通孔8の孔径は被験体細胞の大きさよりも小さいことが必要である。さらに、この微小貫通孔8の上面側に窪みを設けることにより被験体細胞の保持を安定して確実に行うことができる。また、この微小貫通孔8の他面側の開口部は前記センサ素子4の上面側に通じ、片面側の開口部は第二のキャビティ5を介して第三のキャビティ6と連結しており、培養液、

実施などの操作の簡便および損壊なしを可能とする構成を有している。

【0019】

なお、センサ素子4は薄板7が上部になるように形成しているが、本発明においては特に限定されるものではなく、センサ素子4の第二のキャビティ5が上部になるようにセットされていても良い。

【0020】

次に、プレート2の上面には所定の容量を有し、培養液、薬液などの液体を投入したり、蓄えたり、循環させたりすることができるウエルアレイ20を配置している。このウエルアレイ20の下面には第一の流路開口部11に連結した貫通孔21aを有する第一のウエル22と、センサ素子4の上面に連結した貫通孔21bを有する第二のウエル23と、第二の流路開口部18に連結した貫通孔21cを有する第三のウエル24から構成している。さらに、このウエルアレイ20の上面には培養液、薬液などの液体を投入する所定の貫通孔（開口部）を設けている。

【0021】

このようなウエルアレイ20をプレート2の上面に設けることにより、例えば、被験体細胞を含有した培養液を第二のウエル23の一方の貫通孔から投入し、第三のウエル24から吸引ポンプなどの吸引手段によって吸引することによって被験体細胞を含有した培養液は微小貫通孔8を通過し、その後第二のキャビティ5、第三のキャビティ6、第二の流路10および第二の流路開口部18を通過することにより第三のウエル24へと吸引される。

【0022】

このとき、被験体細胞はセンサ素子4に設けた微小貫通孔8を通過することができない孔径に設計しておくことによって微小貫通孔8の上面で保持される。この保持された被験体細胞はこの微小貫通孔8の上にとどまり、電位を測定する対象の被験体細胞となる。また、前記微小貫通孔8を複数個設けることにより一度に複数の被験体細胞の測定を実現することができる。また、この被験体細胞が全ての微小貫通孔8を塞ぐと、それ以外の被験体細胞は第二のウエル23中にとどまり、培養液の流入量も低下することになり、微小貫通孔8の上に被験体細胞が保持されたことを検知することができる。これらの作業は培養液の流量を測定しながら第三のウエル24からの吸引力を制御することによって可能である。

【0023】

なお、前記の動作は第一のウエル22と第二のウエル23においても同様の作業を行うことができる。

【0024】

また、第二のウエル23の上面に設けた開口部を閉じた後、第一のウエル22から薬液を投入し、前記と同じように第三のウエル24から吸引することによって薬液が貫通孔21aを通過し、その後、第一の流路11、第三のキャビティ6、第二のキャビティ5、第二の流路10および第二の流路開口部18を通過して、第三のウエル24へと吸引される。このとき、微小貫通孔8の上面でトラップされている被験体細胞に微小貫通孔8の下面より薬液が接触することになり、被験体細胞が薬液に対して反応する。この反応したときの電位を参照電極14と測定電極15を介して測定することができる。

【0025】

以上説明してきたような構成の細胞電位測定プローブとすることにより、被験体細胞が存在する領域と測定電極15が存在する領域にそれぞれ、別種類の培養液もしくは薬液などの液体を簡便に導入することが可能な細胞電位測定プローブ1を実現することができる。

【0026】

なお、前記ウエル20の構成を三個のウエル22，23，24を基本として説明してきたが、被験体細胞を微小貫通孔8に保持した後、培養液の代わりに第二のウエル23より薬液を投入して、細胞電位の測定を行うときには2個のウエル（例えば第二のウエル23

と第一のウェル 24) に形成することができる。

【0027】

また、プレート 2 の上面と、プレート 2 の上面側に配置するウェルアレイ 20 の底面を同一面とすることにより封止を確実に行うことができることから、液漏れなどを確実に防止することができる。

【0028】

さらに、ウェルアレイ 20 をプレート 2 と同じ材質とすることにより、封止の信頼性を高めることができるとともに膨張係数の違いによる変形などを防止することができる。

【0029】

そして、このウェルアレイ 20 とプレート 2 にポリスチレンを用いることにより、超音波融着などの工法によって封止性と生産性に優れた細胞電位測定プローブを実現することができる。

【0030】

また、このウェルアレイ 20 とプレート 2 にガラス、石英を用いて直接接合などの工法を用いて形成することにより、前記作用に加えて耐熱性に優れていることから加熱洗浄による再利用が可能な細胞電位測定プローブを実現することができる。

【0031】

また、ウェルアレイ 20 を構成する第一のウェル 22、第二のウェル 23、第三のウェル 24 の底面にはそれぞれ貫通孔 21a, 21b, 21c を形成しており、少なくとも前記貫通孔 21b の形状をすり鉢状とすることにより、第二のウェル 23 に投入する培養液あるいは薬液などを速やかにセンサ素子 4 へ浸透させることができる。

【0032】

さらに、前記貫通孔 21b の底面の大きさを微小貫通孔 8 を形成した薄板 7 の外形よりも大きくすることにより、速やかにセンサ素子 4 に設けた微小貫通孔 8 へ被験体細胞を引き込むことができる。

【0033】

また、ウェルアレイ 20 を被験体細胞を含む溶液を投入する第二のウェル 23 と、薬液を投入する第一のウェル 22 と、吸引手段に接続された第三のウェル 24 で構成することにより、プレート 2 の上面に容易に被験体細胞を保持することができるとともに、第二の薬液などを投入することが全てウェルアレイ 20 の上部より独立して行うことができることから測定の実操作性を高めることができる。

【0034】

また、プレート 2 の上面側に設けた第一のウェル 22 の貫通孔 21a の大きさを第一の流路開口部 11 の開口形状よりも大きくし、プレート 2 の上面側に設けた第三のウェル 24 の貫通孔 21c の大きさを第二の流路開口部 18 の開口形状よりも大きくすることにより、薬液などの液体の浸透を速やかに行い、高精度でばらつきの少ない細胞電位を測定できる細胞電位測定プローブを実現することができる。

【0035】

また、必要に応じて細胞電位を測定するための電極として参照電極 14 を第二のウェル 23 の容器の所定の培養液に接する位置に配置し、被験体細胞の変化を測定する測定電極 15 を、例えば第二の流路 10 の内部に培養液あるいは薬液などの液体を介して配置することにより、培養液中における被験体細胞の電位と薬液などを第一のウェル 22 あるいは第二のウェル 23 より投入した後の被験体細胞の細胞電位の変化を測定することができる。また、測定電極 15 は第二のキャビティ 5 あるいは第三のキャビティ 6 の近傍に設けても良い。

【0036】

また、これらの参照電極 14 と測定電極 15 はワイヤ配線、薄膜電極などを形成することにより測定器へ接続して信号を検出することができる。

【0037】

次に、細胞電位の測定を行う手順について簡単に説明する。

【 0 0 3 8 】

まず、第二のウエル 2 3 には被験体細胞を含む培養液を投入し、次に第一のウエル 2 2 もしくは第三のウエル 2 4 に吸引手段を接続して吸引することで被験体細胞はセンサ素子 4 内の微小貫通孔 8 へ保持される。このとき第二のウエル 2 3 内に参照電極 1 4、第二の流路 1 0 の内部に測定電極 1 5 を設置した上で、上記吸引圧力を制御することにより第二のウエル 2 3 に貯留された培養液と第二の流路 1 0 の内部に貯留された培養液の間で抵抗値が $100\text{M}\Omega$ 以上となる、いわゆるギガシール (Giga Seal) が達成される。ここで参照電極 1 4 および測定電極 1 5 は Au、Ag、AgCl などの材料で構成することができ、それぞれの領域に貯留される培養液に接触させることで電氣的接続が完了されるので、これらの電極 1 4、1 5 が配置される箇所は図示される箇所に限定されない。

【 0 0 3 9 】

次に、第一のウエル 2 2 の内部に測定溶液 (薬液など) を貯留して第三のウエル 2 4 側から吸引すれば第一の流路 9、第二のキャビティ 5、第三のキャビティ 6、第二の流路 1 0 の内部の培養液を測定溶液 (薬液) へ置換することができる。

【 0 0 4 0 】

このようにすれば、細胞側領域 (第二のウエル 2 3 側) と測定電極 1 5 側領域 (第三のキャビティ 6 側) に、それぞれ別種類の培養液もしくは測定溶液を簡便に導入することが可能となり、より高速な測定を可能にする。

【 0 0 4 1 】

なお、第一のウエル 2 2 と第三のウエル 2 4 の役割を反対にしても同様の測定が可能である。

【 0 0 4 2 】

また、それぞれのウエル 2 2、2 3、2 4 にバルブを設けることにより、より制御性を高めることも可能である。

【 0 0 4 3 】

次に、前記細胞電位測定プローブを用いた細胞電位測定プローブアレイの構造について図 4 を用いて説明する。図 4 は図 1 に示した細胞電位測定プローブ 1 を縦横 4 列×8 列にマトリックス状に配置した細胞電位測定プローブアレイ 1 9 の構造を示した一例である。図 4 に示したように、センサ素子 4 が配置されたプレート 2 を複数配置した状態で作製することはウエハー状態で一括して作製することが可能である。また、ウエルアレイ 2 0 を前記と同様に多数個並べて配置した状態で一括して作製することも可能である。

【 0 0 4 4 】

このような細胞電位測定プローブアレイの構造を実現することにより、この細胞電位測定プローブアレイを用いてロボットなどを利用して短時間で多数の被験体細胞の薬液効果を判断するための薬品スクリーニングに用いることが可能となる。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 4 5 】

以上のように本発明にかかる細胞電位測定プローブおよび細胞電位測定プローブアレイは、細胞が存在する領域と測定電極が存在する領域にそれぞれ、別種類の培養液もしくは測定液などの液体を簡便に導入することが可能であり、効率的に薬品の薬理効果判定が行えることから、薬品のスクリーニングに有用である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 6 】

【図 1】 本発明の実施の形態 1 による細胞電位測定プローブの分解斜視図

【図 2】 同断面斜視図

【図 3】 同要部拡大断面図

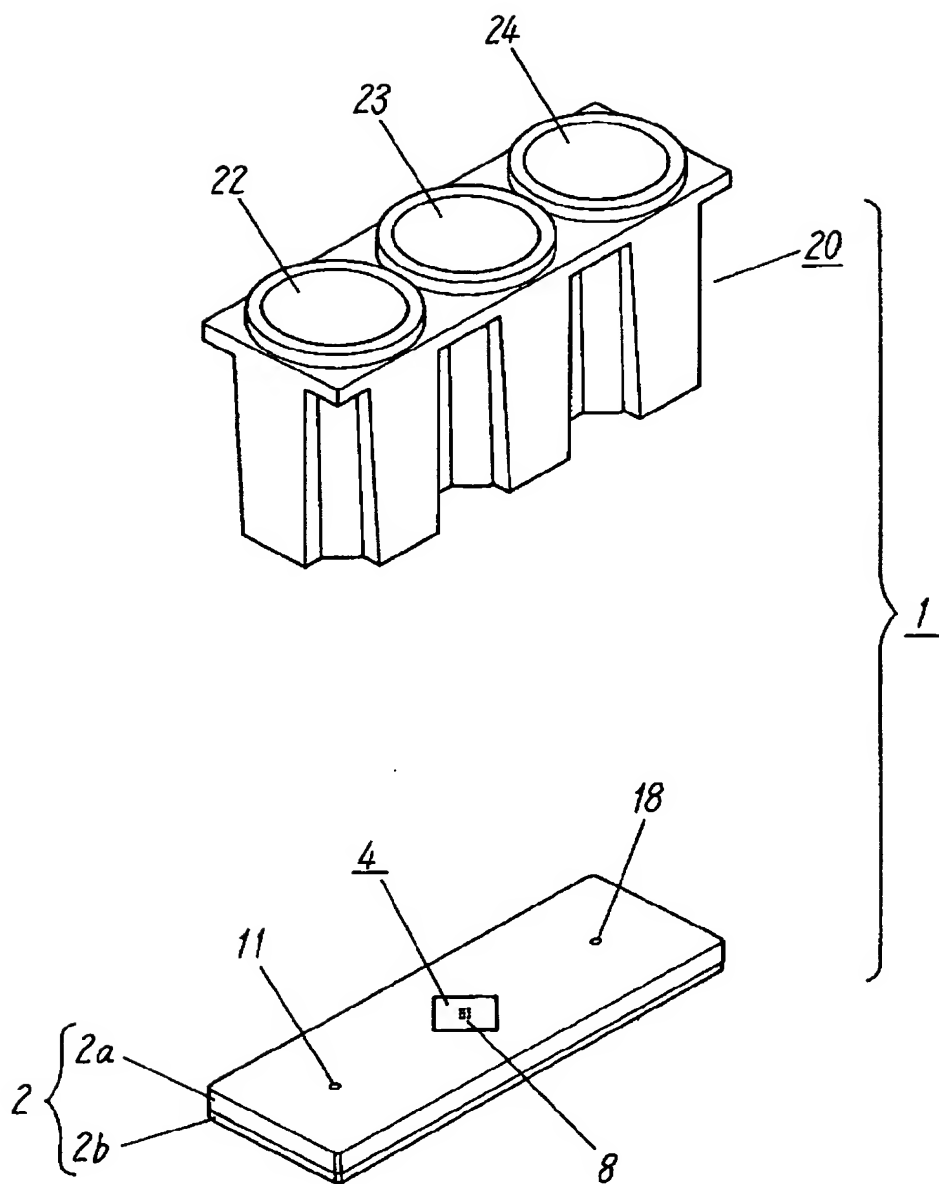
【図 4】 同細胞電位測定プローブアレイの斜視図

【図 5】 従来の細胞電位測定プローブの断面図

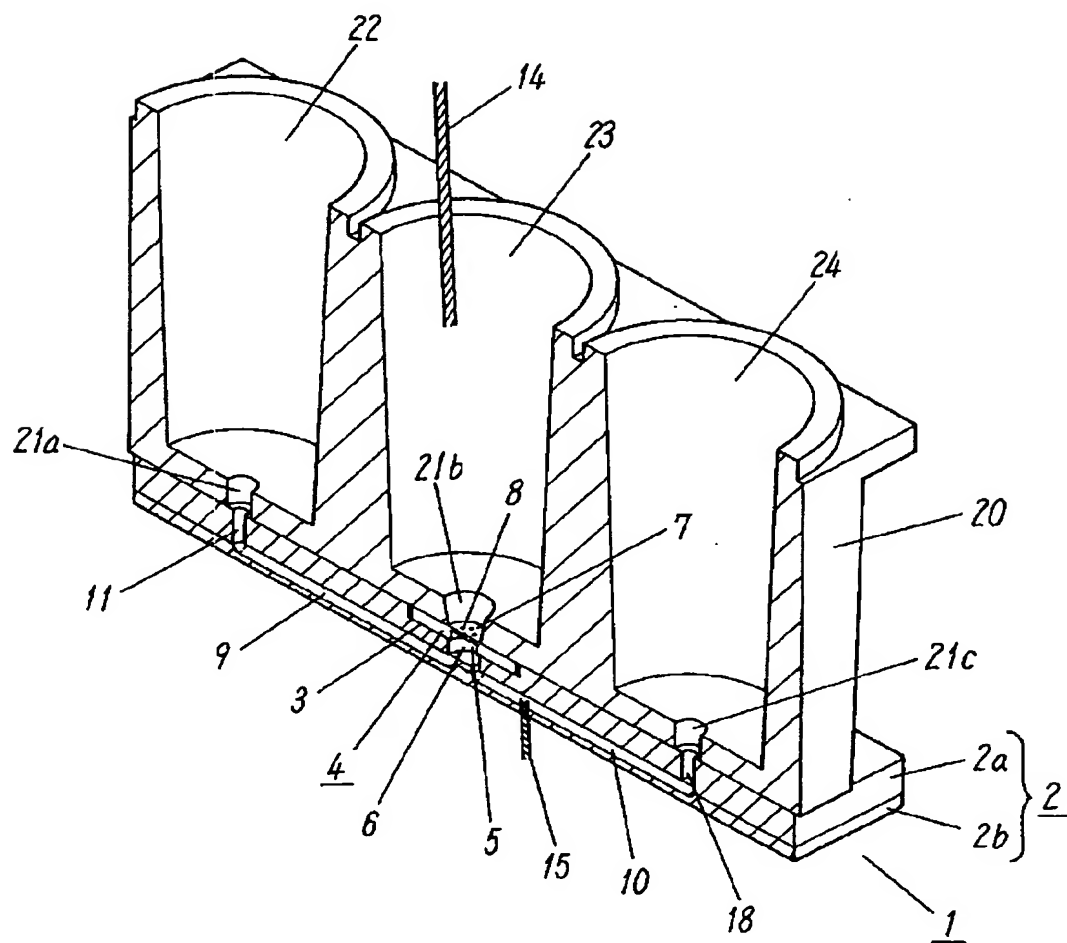
【符号の説明】

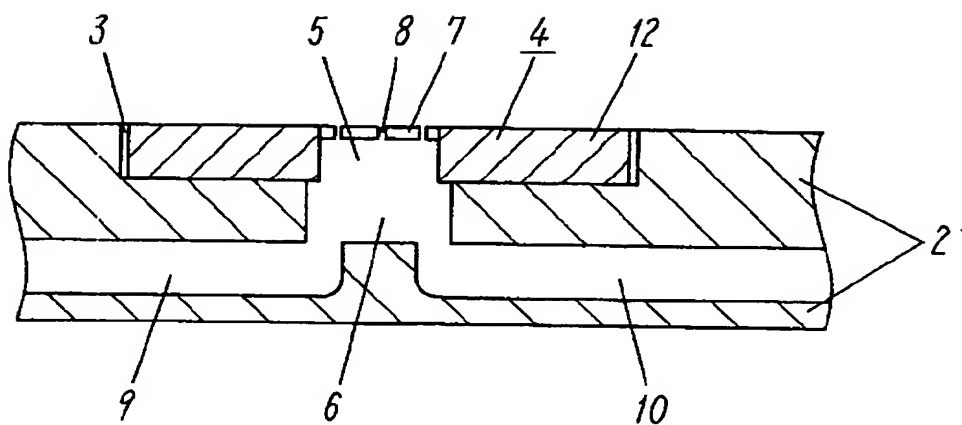
【 0 0 4 7 】

- 1 細胞電位測定プローブ
- 2 プレート
- 2 a , 2 b 成型プレート
- 3 第一のキャビティ
- 4 センサ素子
- 5 第二のキャビティ
- 6 第三のキャビティ
- 7 薄板
- 8 微小貫通孔
- 9 第一の流路
- 1 0 第二の流路
- 1 1 第一の流路開口部
- 1 2 支持基板
- 1 4 参照電極
- 1 5 測定電極
- 1 8 第二の流路開口部
- 1 9 細胞電位測定プローブアレイ
- 2 0 ウエルアレイ
- 2 1 a , 2 1 b , 2 1 c 貫通孔
- 2 2 第一のウエル
- 2 3 第二のウエル
- 2 4 第三のウエル

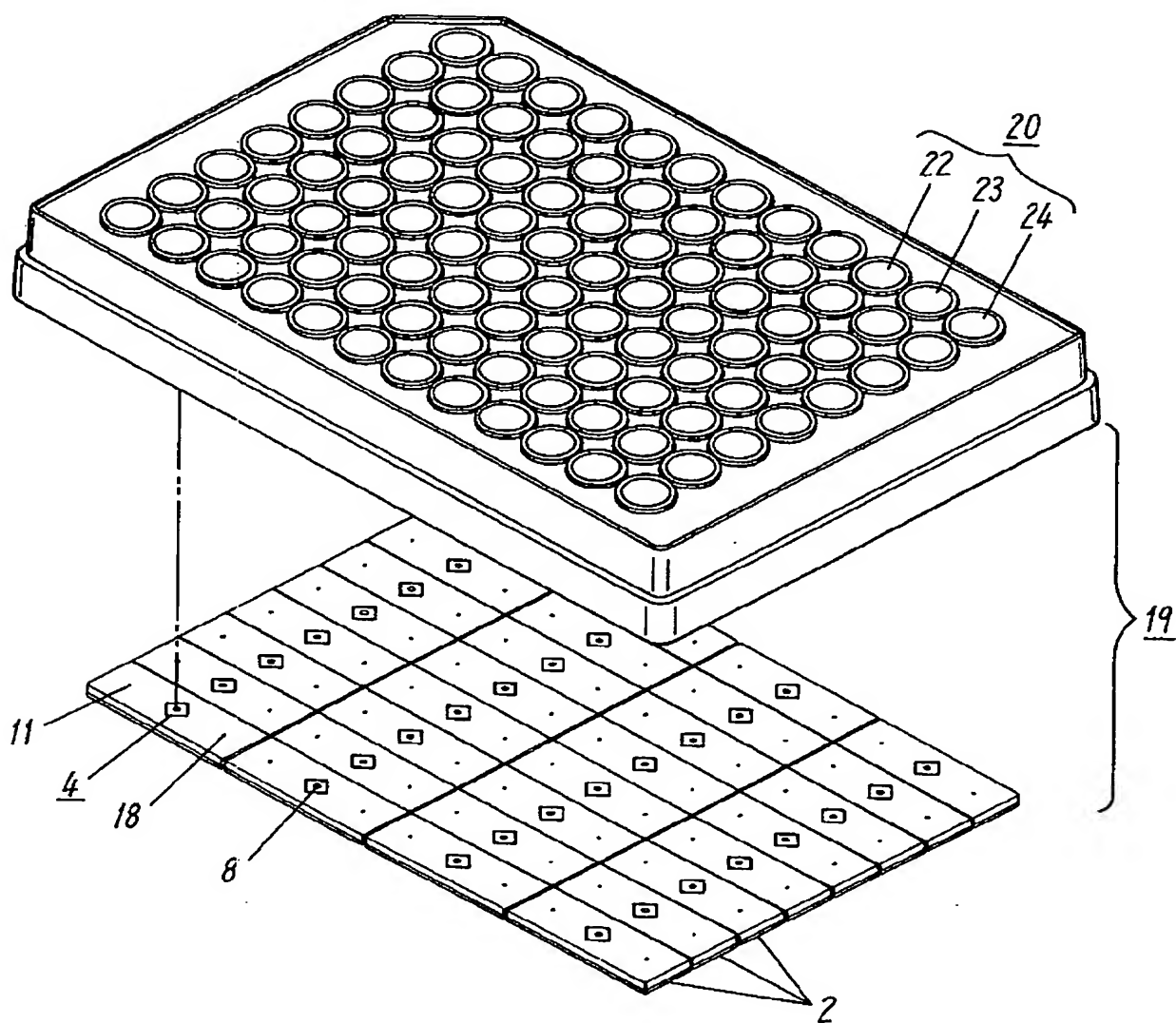


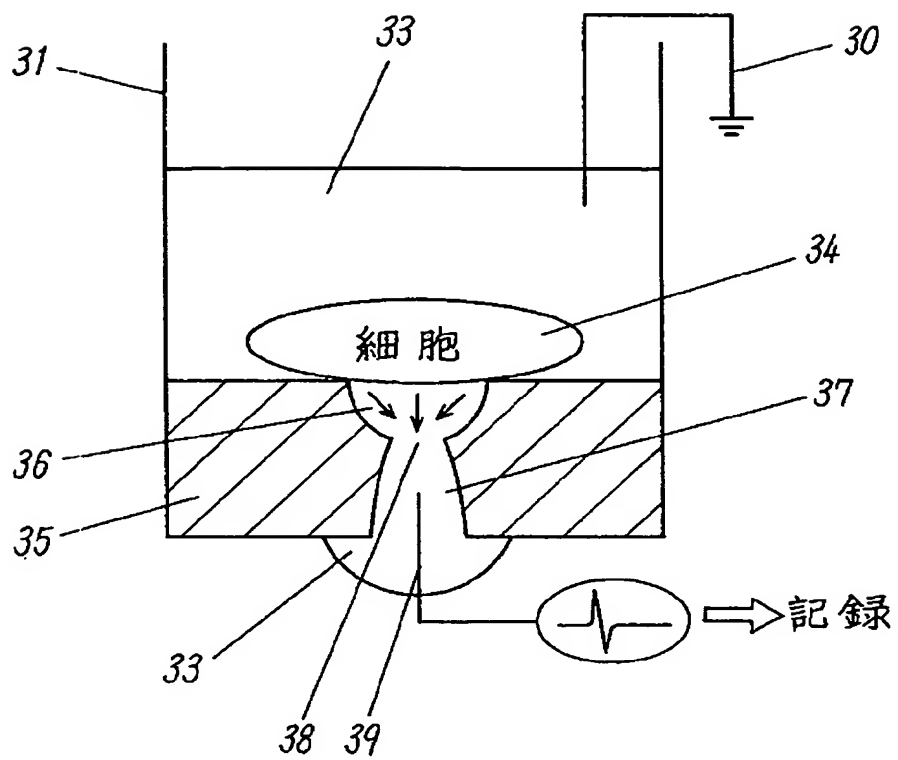
- | | |
|---------------|-------------------|
| 1 細胞電位測定プローブ | 10 第二の流路 |
| 2 プレート | 11 第一の流路開口部 |
| 2a, 2b 成型プレート | 14 参照電極 |
| 3 第一のキャビティ | 15 測定電極 |
| 4 センサ素子 | 18 第二の流路開口部 |
| 5 第二のキャビティ | 20 ウエルアレイ |
| 6 第三のキャビティ | 21a, 21b, 21c 貫通孔 |
| 7 薄板 | 22 第一のウエル |
| 8 微小貫通孔 | 23 第二のウエル |
| 9 第一の流路 | 24 第三のウエル |





【図 4】





【要約】

【課題】被験体細胞が存在する領域と測定電極が存在する領域に別種類の培養液もしくは測定液を簡便に導入できる細胞電位測定プローブおよび細胞電位測定プローブアレイを提供することを目的とする。

【解決手段】ウエルアレイ20と、第一のキャビティ3と第三のキャビティ6を設けたプレート2と、前記第一のキャビティ3の内部にセンサ素子4を設けた細胞電位測定プローブ1であって、センサ素子4は支持基板12と薄板7とを有し、この薄板7には貫通孔8を設け、この貫通孔8の片面側の開口部はセンサ素子4の上面側に通じ、他面側の開口部は流路9、10に通じ、流路開口部11、18に連結するようにプレート2の上部に貫通孔21a、21b、21cを有するウエルアレイ20を設けた構成とする。

【選択図】図2

0 0 0 0 0 5 8 2 1

19900828

新規登録

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

松下電器産業株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP2005/013029

International filing date: 14 July 2005 (14.07.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-323358
Filing date: 08 November 2004 (08.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 01 September 2005 (01.09.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse